PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

TPAG (TRE

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/26070
G01N 35/00		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Mai 1999 (27.05.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Noven		CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Prioritätsdaten: 297 20 432.7 19. November 1997 (19.11.	97) I	Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten auss MWG-BIOTECH AG [DE/DE]; Anzinger S D-85560 Ebersberg (DE).		
 (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEIMBERG, (DE)DE]; Böhmerwaldstrasse (72, D-8556) (DE). WEICHSELGARTNER, Michael (DE/Tail 77, D-85560 Ebersberg (DE). GREBER (DE/DE); DrWintrich-Ring 33, D-85560 (DE). KUTSCH, Peter (DE/DE); (DE). KUTSCH, Peter (DE/DE); (DE). GREBER (DE/DE); (DE). WITSCH, Peter (DE/DE); (Te) Anwalt: GANAHL, Bernhard; Reinhardt Söllner Hausen 5b, D-85551 Kirchheim (DE). 	Ebersbo DE]; a, Mar Ebersbo trasse	rig Im tin 128 24.

- (54) Title: METHOD FOR AUTOMATIC IMPLEMENTATION OF CHEMICAL OR BIOLOGICAL METHODS
- (54) Bezeichnung: VORRICHTUNG ZUM AUTOMATISCHEN DURCHFÜHREN VON CHEMISCHEN BZW. BIOLOGISCHEN VERFAHREN

(57) Abstract

The invention relates to a device for automatic implementation of chemical or biological methods in sample receptacles, especially requencing or amplifying nucleic acid sequences. The inventive system comprises a pipette device and a hemocycler. The pipette device has a pipette arm for pipetting sample substances and/or chemicals. The invention is characterised in that the pipette device and thermocycler are embodied as separate workstations and a handling device is produced so that at least one sampling receptacle containing sample substances or chemicals can be displaced. Said receptacle is embodied separately from the work state.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum automatischen Durchführen von chemischen bzw. biologischen Verfähren in Probengefäßen, insbesondere zum Sequenzieren und zum Amplifizieren von Nucleinsäuresequenzen, mit einer Pipettiereinrichtung einen Pipettieren zum Pipettieren von Probensubstanzen und/och Chemikalien aufweist. Die Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß die Pipettiereinrichtung und der Thermocycler als räumlich getrennte Arbeitsstationen ausgebildet sind, und daß eine Handhabungseinrichtung zum Bewegen von zumindest einem Probensubstanzen bzw. Chemikalien enthaltenden und separat von den Arbeitsstationen ausgebildeten Probengefäß von gegeshen ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Turkei ·
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dånemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Vorrichtung zum automatischen Durchführen von Chemischen bzw. biologischen Verfahren

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum automatischen Durchführen von chemischen bzw. biologischen Verfahren, insbesondere zum Sequenzieren und zum Amplifizieren von Nucleinsäuresequenzen, mit einer Pipettiereinrichtung und einem Thermocycler, wobei die Pipettiereinrichtung einen Pipettierarm zum Pipettieren von Probensubstanzen und/oder Chemikalien aufweist.

Aus der US 5,443,791 geht eine Vorrichtung zum Durchführen von chemischen bzw. biologischen Verfahren hervor, die mehrere Arbeitsstationen aufweist. Diese Arbeitsstationen sind u.a. ein 10 Thermocycler, eine aktiv gekühlte Enzymspeicherstation, eine Waschstation, eine Reagenzienspeicherstation und eine DNA-Probenstation. Bei dieser bekannten Vorrichtung wird eine Pipettierspitze in einer Ebene parallel zur Grundplatte bewegt, um einen Flüssigkeitstransfer auszuführen. Die Reaktionsgefäße 15 dieser Vorrichtung sind als Mulden in einem im Thermocycler fest angeordneten Metallblock ausgebildet. Die einzelnen Reagenzien werden zunächst in einem der sich im Thermocycler befindlichen Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend einem 2.0 Temperaturprofil unterzogen. Bevor eine weitere Reaktion ausgeführt werden kann, muß das bzw. müssen die Reaktionsgefäße gereinigt werden. Falls diese Reaktionsgefäße nicht vollständig gereinigt werden können, ergibt sich eine Kontamination der nachfolgenden Reaktionen, was bei sehr sensitiven Verfahren, 25 wie dem PCR-Verfahren äußerst nachteilig ist. Zudem ist nachteilig, daß die Reaktionsgefäße als Mulden in einem Metallblock ausgebildet sind, die unmittelbar mit den Reagenzien in Kontakt kommen. Metallische Oberflächen können nicht immer absolut

rückstandsfrei mit vertretbarem Aufwand gereinigt werden und bilden eine weitere Ouelle für Verunreinigungen.

Mit Thermocyclern können vorbestimmte Temperaturverläufe bzw.

5 Temperaturprofile abgefahren werden. Thermocycler werden insbesondere in der Gentechnik zum Sequenzieren und Amplifizieren von Nucleinsäuresequenzen verwendet. Solche Verfahren sind z.B. in EP 200 362 B1, EP 258 017 B1 und EP 201 184 B1 beschrieben.

10 Aus der DE 44 12 286 A1 ist ein System zum Verschließen von Probengefäßen mittels Deckel bekannt. Dieses System umfaßt eine Einrichtung zum Öffnen und Schließen der Reaktionsgefäße, die mittels eines Rastmechanismusses einen Deckel erfassen kann und wieder abgeben kann.

15

20

25

30

35

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung der eingangs genannten Art derart weiterzubilden, daß mit ihr automatisch und kontaminationsfrei unterschiedlichste chemische bzw. biologische Verfahren, insbesondere zum Sequenzieren und zum Amplifizieren von Nucleinsäuresequenzen, ausgeführt werden können.

Die Aufgabe wird durch eine Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Die Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß die Pipettiereinrichtung und der Thermocycler als räumlich getrennte Arbeitsstationen ausgebildet sind, und daß ein Handhabungsarm zum Bewegen von zumindest einem Probensubstanzen bzw. Chemikalien enthaltenden und separat von den Arbeitsstationen ausgebildeten Probengefäß vorgesehen ist.

Diese räumliche Trennung der Pipettiereinrichtung und des Thermocyclers und das Vorsehen von den Arbeitsstationen unabhängig ausgebildeter Reaktionsgefäße, die mittels eines Handhabungsarmes zwischen den einzelnen Arbeitsstationen bewegt werden, er-

laubt eine vollautomatische Ausführung komplexer chemischer und biologischer Verfahren mit einem hohen Durchsatz, da sich gleichzeitig in der Pipettiereinrichtung und im Thermocycler Reaktionsgefäße befinden und entsprechend bearbeitet werden können und keine aufwendigen Reinigungsvorgänge an der Vorrichtung ausgeführt werden müssen. Dies führt dazu, daß quasi gleichzeitig und/oder aufeinanderfolgend mehrere komplexe Verfahren, die insbesondere mit völlig unterschiedlichen Reagenzien und Probensubstanzen arbeiten, vollautomatisch ausgeführt werden können.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung erlaubt somit, daß komplexe chemische und biologische Verfahren, insbesondere das Sequenzieren und Amplifizieren von Nucleinsäuresequenzen, vollautomatisch und kontaminationsfrei ausgeführt werden können. Dies stellt eine wesentliche Vereinfachung und eine deutliche Verbesserung der Genauigkeit und Sicherheit der Arbeitsvorgänge dar.

20 Die Ausführungsform nach Anspruch 3 mit einer multi-tasking-Steuerung erlaubt es, daß unterschiedliche Probensubstanzen, Applikationen usw. gleichzeitig mit dem Roboter abgearbeitet werden können, ohne daß hierzu eine Bedienperson zur Überwachung und Kontrolle der einzelnen Prozeßschritte notwendig ist.
25 Hierdurch können komplexeste Verfahrensabläufe auf engstem Raum ohne die Gefahr von Fehlern durch Vertauschen oder dergleichen ausgeführt werden.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung weist eine Einrichtung zum automatischen Öffnen und Schließen von Probengefäßen mittels Deckel auf. Herkömmlicherweise wurde bei automatisch arbeitenden Vorrichtungen das Probengefäß mittels einer Wachs- oder Ölschicht verschlossen. Diese Art des Verschließens hat sich bei der manuellen Durchführung von chemischen und biologischen Reaktionen bewährt. Die Verwendung von lösbar an den Gefäßen befestigten Deckeln weist beim automatisierten Betrieb wesentliche Vorteile gegenüber den

30

35

5

4

herkömmlich verwendeten Wachs- und Ölschichten auf. So kann ein einmal mit Reagenzien und/oder Probensubstanzen gefülltes und mit einem Deckel verschlossenes Gefäß wieder geöffnet und zusätzliche Reagenzien und Probensubstanzen hinzugefügt werden. Die Reagenzien und Probensubstanzen werden mittels einer Pipettierspitze in das Reaktionsgefäß eingebracht, wobei die Pipettierspitze mit kurzem Abstand über dem Flüssigkeitsspiegel im Reaktionsgefäß gehalten wird, so daß keine Berührung der Reaktionsspitze mit den im Reaktionsgefäß enthaltenen Reagenzien und Probensubstanzen erfolgt. Hierdurch wird sicher eine Kontaminierung durch Übertragung von Reagenzien und Probensubstanzen von einem Reaktionsgefäß zu einem anderen Reaktionsgefäß vermieden.

Beim herkömmlichen Versiegeln der Reaktionsgefäße muß die Pipettierspitze beim Pipettieren durch die Wachs- bzw. Ölschicht hindurch stechen und in die im Reaktionsgefäß befindliche Flüssigkeit eintauchen. Bevor man mit der gleichen Pipettenspitze einem weiteren Reaktionsgefäß z.B. die gleiche Substanz zufühzen kann, muß die Pipettenspitze gereinigt oder ausgetauscht werden. Dies ist bei einer manuellen Ausführung von chemischen und biologischen Reaktionen üblich, erhöht bei einer vollautomatischen Ausführung der Reaktionen die Bearbeitungszeit und die Kosten.

25

30

35

10

Treten Bewegungen in der im Reaktionsgefäß enthaltenen Flüssigkeit, bspw. beim Bewegen des Reaktionsgefäßes oder bei einem Siedeverzug während einer Heizphase im Thermocycler auf, so kann eine solche Öl- bzw. Wachsschicht nicht sicher verhindern, daß die Flüssigkeit aus dem Reaktionsgefäß austritt und z.B. in ein benachbart angeordnetes Reaktionsgefäß schwappt.

Zudem ist beim Versiegeln mit Wachs nachteilig, daß dieses beim Abkühlen auf tiefe Temperaturen (z.B. 14°C) erstarrt und die weitere Behandlung behindert.

Die Erfindung wird nachfolgend beispielhaft anhand der beige-

fügten Zeichnungen näher erläutert. Sie zeigen schematisch in:

Fig. 1 ein Ausführungsbeispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung in perspektivischer Ansicht,

Fig. 2 eine typische Anwendung in einem Flußdiagramm, und

Fig. 3 eine weitere Anwendung in einem Flußdiagramm.

- Die erfindungsgemäße Vorrichtung 1 weist eine rechteckförmige Grundplatte 2 mit zwei Stirnkanten 3 und einer vorderen und hinteren Längskante 4 auf. Auf der Grundplatte 2 ist an der hinteren Längskante 4 eine Rückenwandung 6 angeordnet. Am oberen Randbereich ist in der Rückenwandung 6 eine horizontale, zur hinteren Längskante 4 der Grundplatte 2 parallele Schiene 7 vorgesehen auf welcher ein Roboterarm 8 in Längsrichtung der Schiene 7 (Doppelpfeil 9, X-Richtung) verfahrbar angeordnet ist.
- Der Roboterarm 8 ist ein geradliniger, steifer Arm, der paral-20 lel zu den Stirnkanten 3 der Grundplatte 2 angeordnet ist. Er steht somit senkrecht auf der Ebene der Rückenwandung 6. Der Roboterarm 8 weist zur äußeren Begrenzung zwei Längswandungen 10 und an seinem freien Ende eine Stirnwandung 11 auf, die in der Draufsicht U-förmig angeordnet sind. Zwischen den beiden 25 Längswandungen 10 und mit Abstand zu diesen ist eine Schiene 12 angeordnet. An der Schiene 12 sind drei Z-Arme 13 - 15 in Längsrichtung der Schiene 12 (Y-Richtung) verfahrbar vorgesehen. Die Z-Arme 13 - 15 erstrecken sich jeweils vertikal durch einen Spalt 16 zwischen der Schiene 12 und den Längsseitenwan-3.0 dungen 10, wobei zwei der Z-Arme 13, 14 im linksseitigen Spalt 16 und der dritte Z-Arm 15 im rechtsseitigen Spalt 16 angeordnet sind.
- 35 Der Roboterarm 8 ist entlang der Schiene 7 (X-Richtung) und die Z-Arme 13 sind entlang (Y-Richtung) und senkrecht (Z-Richtung) zur Schiene 12 motorgetrieben verfahrbar, so daß die Z-Arme 13

- 15 im wesentlichen den gesamten Bereich (X-, Y-Richtung) oberhalb der Grundplatte 2 abfahren können und in der Höhe (Z-Richtung) verstellbar sind.

- Der Z-Arm 13, der nachfolgend als Pipettierarm 13 bezeichnet wird, weist an seinem unteren Ende ein Aufnahmeelement für eine Pipettenspitze 20 (nur schematisch dargestellt) auf. Die Pipettenspitze ist über einen dünnen Schlauch 21 mit zwei Pumpen 22, 23 verbunden. Die Pumpe 22 ist eine sogenannte Spritzenpumpe (syringe pump), mit welcher kleinste Volumina (1 µl) exakt abgemessen und dosiert gepumpt werden können. Die zweite Pumpe 23 ist eine Waschpumpe, die einen größeren Durchsatz (z.B. ≥ 100 ml/min) als die Spritzpumpe 22 aufweist und zum Waschen der Pipettenspitze 20 verwendet wird.
- Der Z-Arm 14, der nachfolgend als Deckelbetätigungsarm 14 bezeichnet wird, ist an seinem unteren Ende mit einer Einrichtung
 25 zum automatischen Öffnen und Schließen von Gefäßen versehen,
 wie sie aus DE 44 12 286 Al und EP 734 769 Al bekannt sind. Die
 Einrichtung 25 kann mittels eines Rastmechanismusses einen Dekkel erfassen und wieder lösen.
- Die die Proben und Chemikalien enthaltenden Gefäße können bei Gefahr von Kontamination mit jeweils einem Deckel versehen sein, der vom Deckelbetätigungsarm 14 automatisch abgenommen und wieder aufgesetzt werden kann. Diese verschließbaren Gefäße werden insbesondere beim PCR-Verfahren eingesetzt. Beim Sequenzieren ist die Gefahr einer Kontamination geringer, weshalb der Einsatz derart verschließbarer Gefäße nicht zwingend notwendig
- Der dritte Z-Arm 15 wird nachfolgend als Handhabungsarm 15 bezeichnet. Er weist an seinem unteren Ende eine gabelförmige
 Halteeinrichtung 26 auf, mit welcher ähnlich wie bei Gabelstap35 lern Pipettierplatten (nicht dargestellt) aufgenommen, bewegt
 und wieder abgesetzt werden können. In den Pipettierplatten
 sind mehrere in einem Rechteckraster angeordnete, mit einem

Deckel verschließbare Probengefäße ausgebildet. Diese Pipettierplatten können mit dem Handhabungsarm 15 auf der Grundplatte 2 beliebig versetzt werden.

5 Auf der Grundplatte 2 sind ein Probenhalter 27 und zwei Pipettierhalter 28 angeordnet. Der Probenhalter 27 und die Pipettierhalter 28 sind identisch ausgebildete Halterungen, auf welchen die Pipettierplatten einfach aufgesetzt werden. Die auf die Halterungen 27, 28 aufgesetzten Pipettierplatten sind durch diese exakt bzgl. der Grundplatte 2 ausgerichtet, so daß der Ort der einzelnen an den Pipettierplatten ausgebildeten Gefäße exakt festgelegt ist und diese vom Roboterarm, insbesondere dem Pipettierarm 13 und dem Deckelbetätigungsarm 14 genau angesteuert werden können. Die Pipettierhalter 28 legen Pipettierstationen fest, an welchen das Pipettieren ausgeführt wird.

Die Halter 27, 28 sind an der vorderen Längskante 4 der Grundplatte 2 angeordnet, so daß eine Bedienperson einfach Pipettierplatten darauf abstellen kann. Seitlich neben den Haltern 27, 28 ist eine Stapeleinrichtung 29 vorgesehen, die als kleines Regal zum Zwischenspeichern von mehreren, z.B. 5 - 10 Pipettierplatten ausgebildet ist.

Am rückwärtigen Bereich der Grundplatte 2 sind ein Chemikalienreservoir 30, eine Waschstation 31, ein Pipettenspitzenmagazin
32 für Einweg-Pipettenspitzen und ein Pipettenspitzenabstreifer
33 zum Abstreifen der Einweg-Pipettenspitzen vorgesehen. Die
Einweg-Pipettenspitzen sind im Pipettenspitzenmagazin 32 vertikal angeordnet, so daß der Pipettierarm 13 lediglich durch
30 Absenken seines unteren Endes in eine Einweg-Pipettenspitze eine solche aufnehmen kann. Nach Benutzung wird die Einweg-Pipettenspitze im Pipettenspitzenabstreifer 33 abgestriffen.

Am Pipettenspitzenabstreifer ist eine horizontal abstehender

35 Zeiger 34 aus einem elektrisch leitendem und elastischem Material angeordnet. Als Einweg-Pipettenspitzen werden EinwegPipttenspitzen verwendet, die aus einem leitfähigem Material

8

ausgebildet sind, wie z.B. einem Kunststoff, in dem Graphit eingelagert ist.

Nach dem Aufnehmen einer neuen Einweg-Pipettenspitze wird diese mit ihrem oberen, an den Pipettierarm 13 angrenzenden Randbereich mit dem Zeiger 34 in Kontakt oder in seine Nähe gebracht. Der Zeiger 34 ist mit einer Meßeinrichtung verbunden, die eine kapazitiven Messung ausführt. Aufgrund des Ergebnisses dieser kapazitiven Messung kann beurteilt werden, ob eine Einweg-Pipettenspitze am Pipettierarm vorhanden ist, oder ob die Auf-10 nahme der Einweg-Pipettenspitze nicht funktioniert hat. Mit dem Zeiger und der Meßeinrichtung kann somit die Aufnahme einer neuen Einweg-Pipettenspitze kontrolliert werden. Ein wesentlicher Vorteil dieser Kontrolleinrichtung ist, daß bei der Kontrolle die Einweg-Pipettenspitze mit ihrem spitzen Ende nicht 15 mit irgendeinem Gegenstand in Kontakt gebracht werden muß, wie es von herkömmlichen Kontrolleinrichtungen bekannt ist, sondern die Kontrolle der Aufnahme der Einweg-Pipettenspitzen absolut kontaminationsfrei erfolgen kann.

20

Bei Verwendung einer Mehrweg-Pipette kann diese bei Bedarf zwischen den einzelnen Pipettiervorgängen in die Waschstation 31 eingefügt und zum Reinigen mittels der Waschpumpe 23 mit einer größeren Menge an Wasser durchspült werden.

25

30

35

Im Chemikalienreservoir 30 sind mehrere nach oben offene Gefäße mit diversen Chemikalien angeordnet. Die Gefäße des Chemikalienreservoirs 30 können auch mittels Deckel verschlossen sein, die von dem Deckelbetätigungsarm 14 abgenommen und wieder aufgesetzt werden können.

Erfindungsgemäß ist ein Thermcyclerbehälter 35 auf der Grundplatte 2 angeordnet. Der Thermcyclerbehälter 35 besteht aus
einem oben offenen Grundkörper 36, der mittels eines Deckels 37
verschlossen werden kann. Der Deckel 37 ist mit einem Scharniergelenk 38 am Grundkörper 36 befestigt, und um dieses Gelenk
mittels eines Motors (nicht dargestellt) zum automatischen Öff-

nen und Schließen des Thermocyclerbehälters 35 verschwenkbar. Im Thermocyclerbehälter 35 sind Heiz- und Kühlelemente vorgesehen, die den Innenraum auf eine bestimmte Temperatur einstellen können. Mit den Heiz- und Kühlelementen ist es auch möglich, bestimmte Temperaturverläufe abzufahren. Als Heiz- und Kühlelement wird vorzugsweise ein Peltierelement verwendet, das sowohl wärme ab- als auch zuführen kann. Ein typischer Temperaturbereich eines solchen Thermocyclers erstreckt sich von -5°C bis 120°C, und die Temperatur kann mit einer Heiz-/Kühlrate von 2°C/s bis 5°C/s verändert werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung weist eine zentrale Steuereinrichtung auf, die sowohl die Bewegung des Roboterarms 8 mit seinen Z-Armen 13 bis 16, als auch die einzelnen Funktionselemente, wie z.B. die Pumpen 22, 23, und den integrierten Thermocycler ansteuert. Diese Steuereinrichtung ist in der Rückenwandung 6 angeordnet. Sie kann aber auch in einem separaten Gehäuse untergebracht sein oder durch einen separaten Computer dargestellt werden. Die Steuereinrichtung ist vorzugsweise eine prozessorgesteuerte Vorrichtung und als multi-tasking-Steuerung ausgebildet, d.h., daß sie gleichzeitig mehrere Steuerungsvorgänge ausführen und überwachen kann.

Die Steuereinrichtung ist mit einer Schnittstelle zu einem Computer versehen. Im Computer sind mehrere Datenbanken abgespeichert, in welchen die Daten für die einzelnen Applikationen, Probenverwaltung, Chemikalien und Cycler-Programme enthalten sind. Ein Benutzer muß lediglich eine zu untersuchende bzw. zu bearbeitende Probe eingeben, die Art der Applikation (Sequenzieren, Amplifizieren, usw.), die Chemikalien und das Cyclerprogramm auswählen, sofern die letzteren Daten (Chemikalien, Cyclerprogramm) nicht bereits durch die Applikation vorgegeben sind, und die Probe auf dem Probenhalter 27 plazieren.

35 Die erfindungsgemäße Vorrichtung öffnet dann mit dem Deckelbetätigungsarm 14 die die Probensubstanzen und Chemikalien enthaltenden Gefäße, überträgt Teile der Probensubstanzen in die

10

15

10

Reaktionsgefäße der auf den Pipettierhaltern 28 angeordneten Pipettierplatten und versetzt die Probensubstanzen mit den entsprechenden Chemikalien aus dem Chemikalienreservoir 30. Beim Pipettieren werden die Pipettenspitzen vorzugsweise mit geringem Abstand über dem Flüssigkeitsspiegel in den Reaktionsgefäßen gehalten. Hierdurch wird verhindert, daß Reagenzien und Probesubstanzen eines Reaktionsgefäßes in ein anderes Reaktionsgefäß übertragen werden. Dies ist besonders von Vorteil, wenn mehreren Reaktionsgefäßen einer Pipettierplatte die gleiche Substanz zugeführt werden soll, da dies ohne Reinigung der Pipettenspitze zwischen den einzelnen Pipettiervorgängen schnell ausgeführt werden kann.

Die Pipettierplatten werden nach dem Pipettieren vom Handhabungsarm 15 entweder direkt in den Thermocyclerbehälter 35 eingesetzt oder an der Stapeleinrichtung 29 zwischengespeichert
und zu einem geeigneten späteren Zeitpunkt dem Thermocyclerbehälter 35 zugeführt.

- 20 Während im Thermocyclerbehälter 35 eine Probe einem bestimmten Temperaturverlauf unterzogen wird, kann eine weitere Probe mit anderen Probensubstanzen und einer anderen Applikation bereits pipettiert werden.
- 25 Fig. 2 zeigt ein Flußdiagramm einer typischen, einfachen Applikation der erfindungsgemäßen Vorrichtung zum Amplifizieren einer DNA-Probe. Bei dieser Applikation soll eine DNA-Probe amplifiziert, dann sequenzspezifisch gespalten und für eine elektrophoresische Untersuchung vorbereitet werden.

Hierzu wählt der Bediener an einem auf einem Bildschirm des Computers dargestellten Menü die Probensubstanz, eine vorbestimmte Mischung von für das Amplifizieren geeigneten Enzymen, eine weitere vorbestimmte Mischung für das sequenzspezifische Spalten der amplifizierten DNA-Probe und ein Gel und eine Pufferlösung zur Vorbereitung der elektrophoresischen Untersuchung.

30

35

Der Computer erstellt dann selbsttätig sogenannte Pipettier(Pipette.scr) und Thermocycler-Scripte (Cycler.scr) nach Maßgabe der festgelegten Probensubstanzen und Reagenzien. Diese
Scripte enthalten alle zum Füllen der Reaktionsgefäße und zum
Inkubieren notwendigen Steuerbefehle, einschließlich der Transportbefehle zum Bewegen der Pipettierplatten und der Befehle
zum Öffnen und Schließen der Deckel. Die Thermocycler-Scripte
enthalten auch das im Thermocycler auszuführende Temperaturprofil, das bei Bedarf manuell abgeändert werden kann.

Während eines ersten Arbeitsschrittes S1 wird ein Pipettierscript ausgeführt. Hierdurch werden die Gefäße einer Pipettierplatte mit den ausgewählten Probensubstanzen und Reagenzien gefüllt und danach die Pipettierplatte dem Thermocycler zugeführt.

Bei einem zweiten Schritt S2 wird im Thermocycler ein Temperaturprofil abgefahren, um die DNA-Probe gemäß einem an sich bekannten PCR-Verfahren zu amplifizieren. Ist der Amplifikationsvorgang abgeschlossen, wird die Pipettierplatte zu einem Pipettierhalter bewegt.

Im Schritt S3 wird ein weiteres Pipettierscript ausgeführt, wo-25 bei den Reaktionsgefäßen eine vorbestimmte Mischung von Restriktionsendonucleasen hinzugefügt werden. Die Pipettierplatte wird dann wieder zum Thermocycler transportiert und in diesen eingesetzt.

30 Im nachfolgenden Schritt S4 werden die DNA-Proben sequenzspezifisch gespalten, indem sie z.B. für 2 Stunden einer Temperatur von 37°C unterzogen werden, bei welcher die Restriktionsendonucleasen besonders aktiv sind. Danach wird die Temperatur kurzzeitig auf z.B. 95°C erhöht, wodurch die Restriktionsendonucleasen deaktiviert werden. Ist das Spalten der DNA-Proben abgeschlossen, wird die Pipettierplatte wieder zu einer der Pipettierhalterungen 28 bewegt.

5

10

15

PCT/EP98/07423 12

Bei einem Schritt S5 werden den Reaktionsgefäßen Gel und eine Pufferlösung zur Vorbereitung einer elektrophoresischen Untersuchung hinzugefügt.

5

Die Pipettierplatte mit den fertig aufbereiteten DNA-Sequenzen kann nun von einer Bedienperson abgenommen oder automatisch in der Stapeleinrichtung 29 abgestellt werden.

- 10 Fig. 3 zeigt den Ablauf eines weiteren Verfahrens, das mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung vollautomatisch ausgeführt werden kann. Dieses Verfahren dient zur Bestimmung von Längenpolymorphismen in DNA-Bereichen, wie es bspw. im Patent EP 438 512 B1 (=US 5,766,847) beschrieben ist.
- 15 Die Probensubstanz weist hierbei vollständige Zellen auf, die mittels einer Proteinase K in den Schritten S11 und S12 lysiert werden.
- 20 Im Schritt S13 wird ein Gemisch aus Zufalls-Primern (PEP; Primer-Extension-Protocol) hinzugefügt und im Schritt S14 gemäß einem PCR-Verfahren amplifiziert.
- Danach wird im Schritt S15 eine Mischung aus mehreren Primern 25 und Enzymen zur Detektion von sich wiederholenden simplen bzw. kryptisch simplen DNA-Sequenzen (STR; Short-Tandem-Repeats) zugegeben und anschließend das entsprechende PCR-Verfahren ausgeführt (Schritt S16).
- 30 Die in den Fig. 2 und 3 dargestellten Verfahren bzw. Applikationen sind lediglich zwei Beispiele einer Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten der erfindungsgemäßen Vorrichtung. Mehrere dieser Applikationen sind in der Steuereinrichtung vorab programmiert. Der Bediener kann jedoch auch eigene Applikationen
- 35 mit einer beliebigen Folge von Pipettier- und Thermocycler-Scripten zusammenstellen. Die Verfahren können beliebig kompliziert sein und z.B. ein Umschreiben von RNAs auf DNAs umfassen

und sind mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung dennoch vollautomatisch durchführbar.

Insbesondere können unterschiedliche Applikationen gleichzeitig bzw. aufeinanderfolgend automatisch ausgeführt werden, ohne daß ein Bediener die einzelnen Verfahrensschritte überwachen muß. Es ist auch möglich, daß eine Anwendung im Thermocycler und eine andere Anwendung an der Pipettierstation gleichzeitig abgearbeitet wird. Hierzu ist die Steuereinrichtung mit einer zusätzlichen Funktion ausgestattet, die den in der Regel zeitlich 10 kürzeren Pipettiervorgang so startet, daß er gleichzeitig mit der parallel im Thermocycler ablaufenden Inkubation endet. Das beim Pipettiervorgang aufbereitete Gemisch wird somit ohne Standzeit dem Thermocycler zugeführt, wodurch unerwünschte Reaktionen vermieden werden.

Mit der Erfindung wird somit eine Vorrichtung geschaffen, die die vollständige automatische Abarbeitung komplexer chemischer bzw. biologischer Verfahren, insbesondere PCR-Verfahren er-20 laubt, wobei eine maximale Flexibilität bzgl. der Art des angewandten Verfahrens erzielt wird. Es können somit komplexeste Verfahrensabläufe auf engstem Raum ohne der Gefahr von Fehlern durch Vertauschen oder dergleichen ausgeführt werden. Komplexeste chemische bzw. biologische Verfahren, insbesondere das Sequenzieren und Amplifizieren von Nucleinsäuresequenzen, können 25 vollautomatisch mit hoher Effizienz und hohem Durchsatz durchgeführt werden.

Ansprüche

5

10

 Vorrichtung zum automatischen Durchführen von chemischen bzw. biologischen Verfahren in Probengefäßen, insbesondere zum Sequenzieren und zum Amplifizieren von Nucleinsäuresequenzen, mit einer Pipettiereinrichtung und einem Thermocycler, wobei die Pipettiereinrichtung (27, 28) einen Pipettierarm (13) zum Pipettieren von Probensubstanzen und/oder Chemikalien aufweist,

dadurch gekennzeichnet,

- daß die Pipettiereinrichtung und der Thermocycler als räumlich getrennte Arbeitsstationen ausgebildet sind, und daß ein Handhabungeinrichtung (15) zum Bewegen von zumindest einem Probensubstanzen bzw. Chemikalien enthaltenden und separat von den Arbeitsstationen ausgebildeten Probengefäß vorgesehen ist.
 - 2. Vorrichtung nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet,

daß mehrere Probengefäße in einer Pipettierplatte ausgebildet sind, wobei die Pipettierplatte vom Handhabungsarm (15) bewegbar ist.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Vorrichtung (1) eine Steuereinrichtung zum Ansteuern eines Pipettierarms (13), eines Handhabungsarms (15)
und des Thermocyclers (35-38) aufweist, wobei die Steuereinrichtung als multi-tasking-Steuereinrichtung ausgebildet ist.

35

 Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung (1) einen Roboterarm (8) aufweist, der an einer Schiene (7) oberhalb einer Grundplatte (2) verfahrbar ist. und

daß der Pipettierarm (13) und der Handhabungsarm (15) jeweils am Roboterarm (8) angeordnet und vertikal und in Längsrichtung des Roboterarms (8) verfahrbar sind.

- Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet.
- daß der Pipettierarm (13) an seinem unteren Ende eine Pipettenspitze aufnehmen kann und diese über einen dünnen Schlauch (21) mit zumindest einer Pumpe (22, 23) verbunden ist,
- daß sowohl eine fein dosierbare Pumpe (22), z.B. eine

 Spritzenpumpe, als auch eine Pumpe (23) mit einem höheren

 Durchsatz als die feindosierbare Pumpe (22) zum Spülen

 einer Mehrweg-Pipettenspitze mit der Pipettenspitze verbunden sind, und

daß die Vorrichtung (1) ein Pipettenspitzenmagazin (32) für Einweg-Pipettenspitzen und einen Pipettenspitzenabstreifer (33) zum Abstreifen der Einweg-Pipettenspitzen aufweist.

- 6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
- 25 dadurch gekennzeichnet,

daß die Vorrichtung (1) einen Deckelbetätigungsarm (14) zum automatischen Öffnen und Schließen von Gefäßen aufweist.

 Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet,

> daß der Pipettierarm (13), der Deckelbetätigungsarm (14) und der Handhabungsarm (15) jeweils als vertikal angeordnete und vertikal und in Längsrichtung des Roboterarms (8)

- 35 verfahrbare Z-Arme ausgebildet sind.
 - 8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7,

5

10

dadurch gekennzeichnet,

daß die Vorrichtung (1) eine Stapeleinrichtung (29) zum Zwischenspeichern von Probensubstanzen bzw. Chemikalien enthaltenden Gefäßen, insbesondere von Pipettierplatten, an welchen derartige Gefäße ausgebildet sind, aufweist.

 Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet,

daß der Thermocycler einen Behälter bestehend aus einem Grundkörper (36) und einem Deckel (37) zum Verschließen des Behälters (35) aufweist, wobei ein Stellglied zum selbsttätigen Öffnen und Schließen des Behälters (35) vorgesehen ist.

- 15 10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet,
- daß zum Kontrollieren, ob eine Einweg-Pipettenspitze an einem Pipettierarm (13) angeordnet ist, ein elektrisch leitender, frei abstehender Zeiger (34) vorgesehen ist, der mit einer Meßeinrichtung verbunden ist.
 - Verfahren zum Ansteuern einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,

dadurch gekennzeichnet,

- daß beim Pipettieren eine Pipettierspitze mit Abstand über dem Flüßigkeistspiegel im jeweiligen Reaktionsgefäß gehalten wird.
- Verfahren zum Ansteueren einer Vorrichtung nach einem der
 Ansprüche 1 bis 10, insbesondere nach Anspruch 11,
 dadurch gekennzeichnet,
 - daß zwei unterschiedliche Applikation gleichzeitig ausgeführt werden, wobei die Steuereinrichtung den Beginn eines Pipettiervorganges und einer Inkubation im Thermocycler
- 35 selbsttätig derart festlegt, daß sie im wesentlichen gleichzeitig enden.

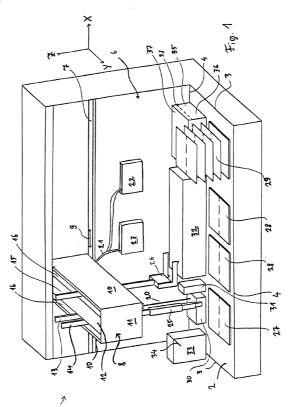
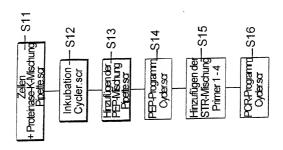
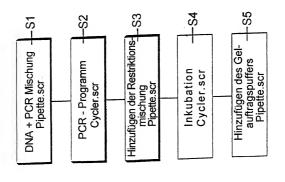


Fig. 3

Fig. 2





ERSATZBLATT (REGEL 26)

WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Buro ATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internati nale Patentklassifikation 6: B01J 19/00, B01L 11/00, C12Q 1/68, C12P 19/34

(11) Internati nale Veröffentlichungsnummer: WO 99/26070

(43) Internati nales

27. Mai 1999 (27.05.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/07423

A3

Veröffentlichungsdatum: (81) Bestimmungsstaaten: JP. US, europäisches Patent (AT, BE,

(22) Internationales Anmeldedatum:

19. November 1998 (19.11.98) CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

297 20 432.7

19. November 1997 (19.11.97) DE

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):

MWG-BIOTECH AG [DE/DE]; Anzinger Strasse 7, D-85560 Ebersberg (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 15. Juli 1999 (15.07.99)

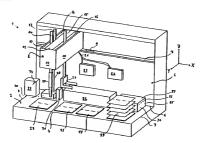
(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HEIMBERG, Wolfgang [DE/DE]; Böhmerwaldstrasse 72, D-85560 Ebersberg (DE). WEICHSELGARTNER, Michael [DE/DE]; Im Tal 77, D-85560 Ebersberg (DE). GREBER, Martin [DE/DE]; Dr.-Wintrich-Ring 33, D-85560 Ebersberg (DE). KUTSCH, Peter [DE/DE]; Hoppenbichlerstrasse 24, D-83022 Rosenheim (DE).

(74) Anwalt: GANAHL, Bernhard; Reinhardt Söllner Ganahl, Hausen 5b, D-85551 Kirchheim (DE).

(54) Title: METHOD FOR AUTOMATIC IMPLEMENTATION OF CHEMICAL OR BIOLOGICAL METHODS

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG ZUM AUTOMATISCHEN DURCHFÜHREN VON CHEMISCHEN BZW. BIOLOGISCHEN VERFAHREN



(57) Abstract

The invention relates to a device for automatic implementation of chemical or biological methods in sample receptacles, especially for sequencing or amplifying nucleic acid sequences. The inventive system comprises a pipette device and a themocycler. The pipette device has a pipette arm for pipetting sample substances and/or chemicals. The invention is characterised in that the pipette device and thermocycler are embodied as separate workstations and a handling device is provided so that at least one sampling receptacle containing sample substances or chemicals can be displaced. Said receptacle is embodied separately from the work stations.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zum automatischen Durchführen von chemischen bzw. biologischen Verfahren in Probengefäßten, insbesondere zum Sequenzieren und zum Amplifizieren von Nucleinsäuresequenzen, mit einer Pipertierierinichtung einem Thermoeycler, wobei die Pipertierinichtung einem Pipertieram zum Pipettieram zum Pipettieram von Probensubstanzen und/oder Chemikalien aufweist. Die Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß die Pipettiereinrichtung und der Thermoeycler als räumlich getrennte Arbeitsstationen ausgebildet sind, und daß eine Handhabungseinrichtung zum Bewegen von zumindest einem Probensubstanzen bzw. Chemikalien enthaltenden und separat von den Arbeitsstationen ausgebildeter Probengefäß vorgesehen ist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanica	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana-	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten vo
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumānien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interne alex Aktenzeichen.
PCT/EP 98/07423

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES B 01 J 19/00, B 01 L 11/00, C 12 Q 1/68, C 12 P 19/34 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK6 B. RECHERCHIERTE GERRETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) B 01 J,C 12 P,G 01 N,C 12 Q,B 01 L Recherehierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherehierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte eiektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbernife) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr. 1 - 12US 5443791 A Α (CATHCART et al.) 22. August 1995 (22.08.95), Spalte 6, Zeile 40 - Spalte 9, Zeile 40, Spalte 17, Zeile 31 - Spalte 21, Zeile 27, Zeichnungen, Ansprüche (in der Beschreibung genannt). 1 - 12DE 4412286 A1 Α (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 12. Oktober 1995 (12.10.95), Spalte 2, Zeile 53 - Spalte 4, Zeile 1, Zeichnungen, Ansprüche (in der Beschreibung genannt). Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu x Siehe Anhang Patentfamilie Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist. oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zumVerständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist X. Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindt kann allein aufgrund dieser Veröffendiehung nieht als neu oder auf erfindenischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Pnortaissanspruch zweifelhaft er-schannen zu laszen, oder durch die das Veröffendlichungsdatum einer anderen im Rechnerhenben eht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit berühend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategone in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahellegend ist on bei use au geführt.

Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benzutung, eine Ausstellung oder andere Malbahmen bezieht veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatun, aber nach erheitenden Prinzipitien Professiolaum veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatun, aber nach dem bezampreiten Prinzipitien Professiolaum veröffentlichte vorden ist veröffentlichung, die Mitglied derseiben Patentfamilie in Datum des Absehlusses der internationalen Recherche Absendedatum des internationalen Recherchenbenehts 25 März 1999 2 8, 04, 99 Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Bevollmächtigter Bediensteter Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijkwijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 TENGLER e.h.

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

nt K	ennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teil	e Betr. Anspruch Nr.
· - · · · ·	structuring der Veronientrichung, zorten er broanten unter Angabe der mangebrenen ven	Sea. Anspiden Nr.
- [
. [TD 0001101 10	١.
A	EP 0201184 A2	1
)	(CETUS CORPORATION)	
1	17. Dezember 1986 (17.12.86),	1
. 1	Ansprüche	
1	(in der Beschreibung ge-	
	nannt).	
1		
1		1
1		1
1		ì
1		1
1		1
1		
- 1		. 1
- 1		
1		
j		1
1		1
		(
		1
		1
1		
1		
1		1
1		
1		l l
- 1		
- 1		
1		
- 1		ì
1		
		1
1		
		1
		1
l		1
		1
1		
1		
		1
1		
		1
l l		
1		1
		ì

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

		PCT/EP 98/0)7423
A. CLAS	SIFICATION OF SUBJECT MATTER 6 B 01 J 19/00, B 01 L 11/00, C 1	12 Q 1/68, C 12 P 19/34	
According to	International Patent Classification (IPC) or to both	national classification and IPC	
	OS SEARCHED		
Minimum do	cumentation searched (classification system followed by	classification symbols)	
IPC	6 B O1 J, C 12 P, G O1 N, C 12 Q	, B 01 L	
Documentation	on searched other than minimum documentation to the en	xtent that such documents are included in the	ne fields searched
Electronic dat	ta base consulted during the international search (name o	of data base and, where practicable, search t	erms used)
C. DOCUM	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where ap	propriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Α	US 5443791 A (CATHCART et al.) 22 August 1995 (22.08.95)		1-12
	Column 6, Line 40- Column 9, Line 40, Column 17, Line 31- Column 21, Line 27, Drawings, claims (Cited in the description)		
A	DE 4412286 A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 12. Oktober 1995 (12.10.95 Column 2, Line 53- Column 4, Line 1, Drawings, claims (cited in the description)		1-12
X Further	r documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.	
"A" documen	categories of cited documents: at defining the general state of the art which is not considered particular relevance	"T" later document published after the inte date and not in conflict with the appli the principle or theory underlying the	mational filing date or priority cation but cited to understand invention
"E" earlier d "L" document cited to special s	ocument but published on or after the international filing date nt which may throw doubts on priority claim(s) or which is establish the publication date of another citation or other reason (as specified)	step when the document is taken alor "Y" document of particular relevance; the	dered to involve an inventive te claimed invention cannot b
"P" documen	nt referring to an oral disclosure, use, exhibition or other nt published prior to the international filing date but later than rity date claimed	being obvious to a person skilled in t	documents, such combination he art
	actual completion of the international search	Date of mailing of the international sea	
	25 March 1999 (25.03.99)	28.04.99	(28.04.99)
Name and m	nailing address of the ISA/	Authorized officer	
Europe	ean Patent Office		

Telephone No.

Facsimile No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP 98/07423

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate,	f the relevant passages	Relevant to claim No
A	EP 0201184 A2 (CETUS CORPORATION) 17. December 1986 (17.12.86), claims (cited in the description)		1
			8

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)